

T S1/5

1/5/1

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI

(c) 2006 The Thomson Corp. All rts. reserv.

016013865

WPI Acc No: 2004-171716/200417

XRAM Acc No: C04-068056

XRPX Acc No: N04-136831

Assay of protein in urine samples, involves preliminarily reacting samples with silver ion, followed by reacting with reducing agent containing ferrous sulfate

Patent Assignee: TSUNEMITSU KK (TSUN-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 2002236127	A	20020823	JP 200173092	A	20010208	200417 B
JP 3518746	B2	20040412	JP 200173092	A	20010208	200425

Priority Applications (No Type Date): JP 200173092 A 20010208

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 2002236127	A		4	G01N-033/68	
JP 3518746	B2		4	G01N-033/68	Previous Publ. patent JP 2002236127

Abstract (Basic): JP 2002236127 A

NOVELTY - Urinary protein in sample is spotted by preliminarily reacting the sample with a silver ion followed by reacting with a reducing agent containing ferrous sulfate.

USE - For assaying highly sensitive trace proteins in urine.

ADVANTAGE - The method effectively, sensitively and easily determines urinary protein fixed by sulfosalicylic acid and trichloroacetic acid.

pp; 4 DwgNo 0/1

Title Terms: ASSAY; PROTEIN; URINE; SAMPLE; PRELIMINARY; REACT; SAMPLE;

SILVER; ION; FOLLOW; REACT; REDUCE; AGENT; CONTAIN; FERROUS; SULPHATE

Derwent Class: A96; B04; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/68

International Patent Class (Additional): C07K-017/12

File Segment: CPI; EPI

?

THE
(CLASS) XNV TO 20K (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-236127

(P2002-236127A)

(43) 公開日 平成14年8月23日 (2002.8.23)

(51) Int.Cl.⁷
G 0 1 N 33/68
// C 0 7 K 17/12

識別記号

F I
G 0 1 N 33/68
C 0 7 K 17/12

テームト (参考)
2 G 0 4 5
4 H 0 4 5

審査請求 有 請求項の数 3 書面 (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願2001-73092(P2001-73092)

(22) 出願日 平成13年2月8日 (2001.2.8)

(71) 出願人 000146445

株式会社常光

東京都文京区本郷3-19-4

(72) 発明者 芝 紀代子

東京都千代田区一番町20-9 一番町ハウス503

(72) 発明者 平塚 信夫

東京都小金井市貫井北町1-16-9

(72) 発明者 松田 武英

神奈川県川崎市高津区宇奈根731-1 株式会社常光内

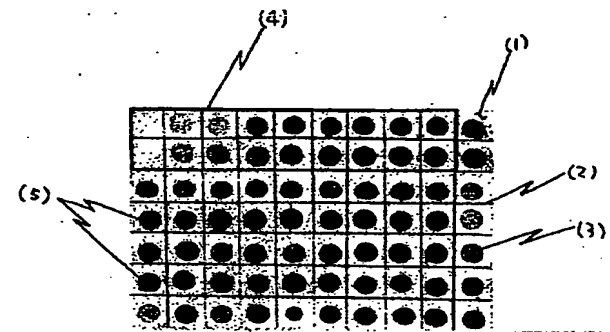
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 銀染色による高感度微量蛋白定量法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、免疫学的な方法を使わず微量の尿蛋白質を、高感度にかつ簡便に多数の検体を定量出来る方法である。

【解決手段】 本発明による染色液は、銀イオンを硫酸第一鉄による還元剤とあらかじめ反応させ銀コロイド状にした後、セルロースアセテート膜中の蛋白と銀コロイドを結合させ安定化する方法を使用することにより定量化することが可能となった。本発明は、緩衝化しない乾燥状態にあるセルロースアセテート膜に直接検体を一定量点着し、この状態のまま蛋白質をスルホサリチル酸とトリクロル酢酸で固定した後、希釈した酢酸溶液で良く洗浄する。洗浄後、前述の銀染色液で蛋白質を染色することで課題を解決した。



【特許請求の範囲】

【請求項1】乾燥状態にある高分子多孔質膜上に一定量の検体を多数点着し、その中の微量蛋白質を固定化した上で、銀を特異的に結合させ可視状態にすることにより、微量蛋白質を定量できることを特長とした銀染色高感度微量蛋白定量法。

【請求項2】乾燥状態にある高分子多孔質膜上に固定した微量蛋白を染色する銀染色液は、銀イオンを還元剤とあらかじめ反応させコロイド状にした後、高分子多孔質膜上の蛋白と結合させることで安定化し、かつ支持体の高分子多孔質膜自体を染めないことを特長とする銀染色による高感度微量蛋白定量法。

【請求項3】高分子多孔質膜上に固定された「銀-蛋白質結合体」を、アルカリ性の固着液でさらに安定なコロイド状態にすることを特長とする銀染色による高感度微量蛋白定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】ヒトの臨床検査を行う上で、最も簡単に安価にかつ人体に何の苦痛も無く採取出来る検体の1つとして尿検査は重要視され、初診時や住民検診などで、尿糖・尿蛋白質などの検査が日常的に実施されている。本発明は、その中の1つである尿蛋白質の定量検査に関するものである。普通ヒトにおいて正常成人の尿蛋白質の出現は、1日150mg/L以下と言われている。この150mg/Lという濃度は、血中総蛋白質の量に比べ1/1000程度である。尿蛋白質の約40%は、アルブミンであり、残りの60%はいろいろな種類のグロブリンである。病的な尿蛋白の出現は、腎前性蛋白尿（ベンスジョーンズ蛋白尿、ヘモグロビン尿、ミオグロビン尿）や腎性蛋白尿のうち糸球体性蛋白尿（糸球体腎炎、腎盂腎炎、ネフローゼ、腎硬化症、妊娠腎）、循環障害（うっ血腎、ショック腎）、その他の腎前性蛋白尿（黄疸、脳出血、脳震盪とう、重症貧血、多血症、糖尿病、胃炎、腸閉塞、熱射病、甲状腺機能亢進症）、尿細管性蛋白尿（ファンconi症候群、水銀・カドニウム中毒）、腎後性蛋白尿（腎盂以下の炎症、結石、腫瘍、潰瘍）などが知られている。尿の中に含まれる蛋白を検査する方法としては、定性検査と定量検査がある。定性検査は、尿試験紙法による検査に代表されるように、尿中にある一定量以上の蛋白が含まれているかどうか、または多量に含まれているかどうかなど大まかに調べる方法である。それに対して定量検査は免疫法や色素結合法で代表されるように蛋白の濃度が数値で得られるような検査で、医療機関が患者の重症度の判定、あるいは経過観察などのために行うものとされてきた。

【0002】

【従来の技術】検査法：従来使われている尿蛋白質の検査法は、スルホサリチル酸法と煮沸法及び試験紙法などの定性検査が主体である。特に試験紙法は、住民や学童

の健康診断などに広く使われており良く知られている。尿蛋白質の定量検査は、尿中に排出される尿蛋白質が非常に微量のため放射線標識免疫測定法（RIA）、酵素標識免疫測定法（EIA）、ラテックス凝集測定法（LAPPA）、免疫比濁法（TIA）などの免疫学的な測定法が使われている。これらの測定法は全て抗原抗体反応を利用する免疫学的測定法である。免疫学的測定法は微量の蛋白質を測定するのに利用できるが、高価な抗体を使用するので測定キットは非常に高価なものになっている。これらの測定法の感度は、ほぼ50mg/Lを目標に作られている。これらの測定キットは蛋白質のうちアルブミンを特異的に検出する測定法が多く、総蛋白質を測定するものではない。発明の属する技術分野で説明したように、尿中のアルブミンは蛋白質の約40%を占め残りの60%は各種のグロブリンの集合体である。もしグロブリンも測定する測定法を作る場合は各種のグロブリンに対応して多くの抗体を使うか、その特異性を吟味してキットを作らねばならないので、総蛋白質を定量する免疫学的測定法は実質高価になりすぎ実用的ではない。結局免疫学的測定法はそれぞれの特異蛋白質を個々に測定するのに有効な測定法で、高感度で簡便にかつ安価に総蛋白質を測定する方法は開発されていなかった。一般的には色素結合法が用いられているが、感度は約300mg/Lと低い。尿中蛋白質には、M蛋白（ベンスジョーンズ蛋白、多発性骨髄腫などの腫瘍細胞が産生する蛋白）やIgG（非選択的糸球体性蛋白尿）、α1ミクログロブリン・β2ミクログロブリン（尿細管性蛋白尿、糸球体、混合性蛋白尿尿）などのグロブリン領域の蛋白質もある。医師は、尿中の総蛋白質（定量値）や尿蛋白分画を見ながら総合的に診断を行い、治療をすることが求められているが、従来の測定法では感度が低いので診断にあまり役に立っていなかった。個別的な技術について：従来利用していた支持体であるポリアクリルアミドゲルやアガロースゲル用の銀染色液は、銀イオンをこれらのゲル中の蛋白と結合させた後、ホルマリンなどの還元剤で還元して銀粒子にする方法であった。この従来の銀染色液は、高分子多孔質膜の一種であるセルロースアセテート膜の蛋白質を全く染色できなかったため、使用されていなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、免疫学的な方法を使わず微量の尿蛋白質を、高感度にかつ簡便に多数の検体を定量出来る方法である。高価な抗体を使わない点で安価な測定法を提供できるようになった。「従来の技術」で述べたように、50mg/L程度の濃度を定量するには、高価な抗体を使う免疫学的測定法を利用するのが普通である。本発明は抗原抗体反応を使わず微量の蛋白質を安価に測定できるようにした点が特長である。また、高感度用として従来から使用されていた銀染色法は、ポリアクリルアミドゲルまたはアガロースゲル

を使用しており、言い換えればポリアクリルアミドゲルまたはアガロースゲルのようなゲル状の支持体でないと目的の蛋白質をうまく染めることが困難あるのみならず操作が非常に煩雑でかつ長時間を要していた。従来から、支持体の1つであるセルロースアセテート膜電気泳動用として使われている蛋白質の染色液には、ニグロシンやピロガロールレッドおよびアシッドレットなどがあるが、これらは蛋白質の定量のためには感度が悪かった。本発明は、従来困難であった高分子多孔質膜の支持体の1つであるセルロースアセテート膜に微量蛋白質の染色固定が出来ようになったばかりか、その支持体自身へ吸着の無い銀染色液を使用することにより緩衝化した高分子多孔質膜を使用して銀染色すると緩衝剤が蛋白質に干渉することにより銀が蛋白に固着しにくくなり定量出来なかった。この銀染色法を定量に用いるためには、支持体に蛋白質を安定に固定しなければならず、また支持体自体を染めないという条件が必要であった。さらに光学的にその濃度を測定するためには、透明化あるいは半透明化しても染まった銀コロイドが溶け出さず安定的に固定されていなければならない。

【0004】

【課題を解決するための手段】従来の技術で述べたような従来の銀染色法を、ポリアクリルアミドゲル等を用いる場合に比し遙かに安価で操作の簡便な高分子多孔質膜に使用すると銀が固定されず結果的に使用できなかった。本発明は、高分子多孔質膜に使用する染色液にするため、銀イオンを硫酸第一鉄による還元剤とあらかじめ反応させ銀コロイド状にした後、セルロースアセテート膜中の蛋白と銀コロイドを結合させ安定化する方法を使用することにより定量することが可能となった。本発明は、緩衝化しない乾燥状態にあるセルロースアセテート膜に直接検体を一定量点着し、この状態のまま蛋白質をスルホサリチル酸とトリクロル酢酸で固定した後、希釈した酢酸溶液で良く洗浄する。洗浄後、前述の銀染色液で蛋白質を染色することで課題を解決した。高分子多孔質膜に、乾燥したものを使用したものは、緩衝液・水分その他の液体で湿润状態にあるものを使用する場合に比して感度が高くなるばかりでなく均一度・精度を著しく向上させることが出来た。さらに炭酸水素ナトリウムと炭酸ナトリウムからなるアルカリ性の固着液で「銀-蛋白質結合体」をより完全に固定させた。これにより支持体の透明化に用いるデカリンや流動パラフィンおよび透明化試薬にも「銀-蛋白質結合体」が溶け出さず安定になり精度が著しく向上した方法を発明する事が出来た。

【0005】

【発明の実施の形態】本発明は、銀染色液として硝酸銀の他、硫酸銀・乳酸銀などを用いる事が出来る。さらに還元剤として硫酸第一鉄の他、亜硫酸ソーダ・ホルマリン・塩化錫（2価）などを用いる事ができる。アルカリ性

固着剤として炭酸水素ナトリウム-炭酸ナトリウム溶液の他、グリシン-水酸化ナトリウム溶液、トリスアミノメタン-水酸化ナトリウム溶液等を用いる事が出来る。

【実施例1】図1において緩衝化しない乾燥状態のセルロースアセテート膜（1）上にボールペン等で等間隔に区画（2）をつくり、その1つ1つの中心に、検量線用の標準液と患者の尿検体をマイクロピペットで正確に3 μ Lずつ点着塗布（3）する。この検体を塗布したセルロースアセテート膜を0.2g/dLのスルホサリチル酸1容と9.8g/dLのトリクロル酢酸1容からなる固定液で先ず蛋白質を固定する。固定後1%酢酸で十分洗浄し、表1に示す銀染色液で蛋白質を染色する。染色後水洗し0.1M炭酸水素ナトリウムと0.1M炭酸ナトリウムからなるアルカリ性の固着液（PH:9.0）でさらに固着する。乾燥後デカリンで透明化または透明化試液の泳動用緩衝液で透明化して比色計（濃度計）で吸光度を測定して、検量線から濃度を求める。図1において枠で囲んだ（4）は、検量線用の既知濃度の蛋白質を銀染色したもので、蛋白質が薄いものが一番左で、右に順次移る度に濃度が濃くなっている。枠（4）で囲んでいないドット（5）は52人の患者尿検体を点着し固定して銀染色をしたものである。図2は図1の枠（4）で囲んだ部分いわゆる検量線用のドットを比色計で読みとり、その吸光度（OD）を縦軸に、検量線用の既知蛋白濃度（mg/L）を横軸にプロットした検量線である。次に濃度未知の尿検体を銀染色したドット（5）を比色計で読み取った吸光度（6）を図2の検量線の縦軸に当てはめて、検量線と交わる点に垂線を立てて横軸と交わった濃度を読みとり、未知濃度の尿検体の総蛋白質の濃度が測定できた。この濃度を求める方法は、コンピュータ等を使うことにより瞬時に求めることが出来た。これにより求められた微量尿蛋白質の濃度は、わずかに2.5mg/Lの濃度から測定できた。

表1 銀染色液

クエン酸ソーダ	280mM
Tween20	0.25%v/v
硫酸第一鉄	15mM
硝酸銀	350mM
酢酸	15%v/v

【実施例2】緩衝化しない乾燥状態のセルロースアセテート膜上に、一定間隔に検量線線用の標準液と患者の脳脊髄液を多数点着出来る自動式マイクロピペットで正確に3 μ Lずつ図1のように点着塗布する。その後実施例1と同様に、この検体を塗布したセルロースアセテート膜を0.2g/dLのスルホサリチル酸1容と9.8g/dLのトリクロル酢酸1容からなる固定液で先ず蛋白質を固定し、1%酢酸で十分洗浄し、銀染色液で蛋白質を染色する。そしてアルカリ性の固着液（PH:9.0）

0)でさらに固着する。乾燥後デカリンで透明化または透明化試液の泳動用緩衝液で透明化して比色計(濃度計)で吸光度を測定して、検量線から濃度を求めた。この濃度を求める方法は、コンピュータ等を使うことにより瞬時に求めることが出来た。これにより求められた微量脳脊髄液中の蛋白質の濃度は、わずか2.5mg/Lの濃度から測定できた。実施例2では脳脊髄液の定量が出来ることを示したが、蛋白質濃度の低い例えば、涙・唾液・血漿蛋白質の希釈検体および他の動植物の微量蛋白質などを同様に操作することでそれぞれ定量する事が出来る。

【実施例3】実施例1において、高分子多孔質膜として緩衝化しない乾燥状態のセルロースアセテート膜を使用した。その他の高分子多孔質膜としてろ紙・ナイロン膜・ニトロセルロース膜・ポリスルホン膜等も支持体として用いて同様の操作法で定量する事が出来た。

【0006】

【発明の効果】本発明により、高価な抗原抗体反応を使用することなく微量蛋白質を2.5mg/Lから簡便かつ安価に定量出来るようになった。従来の技術で述べたように抗原抗体測定法で定量できるのはアルブミン等個々の特異的蛋白質であって、総蛋白質を2.5mg/Lから測定できる測定法は本発明が最初の測定法である。この発明を活用することで、腎症患者特に腎障害の初期において正確に的確に診断出来るようになり、治療効果の把握にも活用出来る。また医薬品(例えば抗癌剤や抗

生物質)等の投与による副作用としての腎障害を早期に見つける事が出来る。また学童検診や住民検診及び人間ドック等における検診分野においても、異常をより早期発見することが出来るようになる。早期発見で疾病の発病を遅らせたり、早期に治療できることにより、本人の健康維持に役立つとともに、結果的に医療費を減少させることが出来るので社会に大きく貢献できることになる。一般的には、検診や病院での初期検査において、最初の総蛋白質の検出感度が悪ければ、正常として見逃され結果的に、次のステップの検査を実施する事は事実上不可能である。本発明により、微量の尿蛋白質の出現を検知出来ることは、出現した蛋白質が異常なのか正常なのか、次の検査をするかどうかの判断材料を与える事になる。(次の検査とは、電気泳動法または免疫電気泳動またはその他の免疫学的定量法を意味する。)

【図面の簡単な説明】

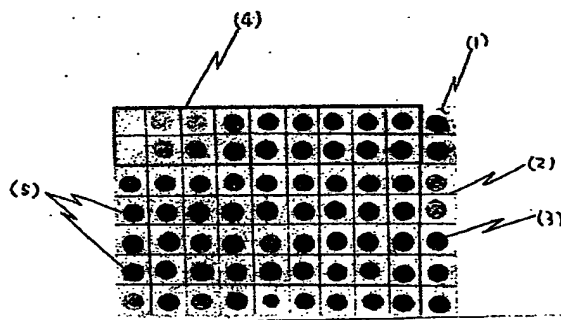
【図1】本発明により染色されたドットプロット

【図2】検量線の図

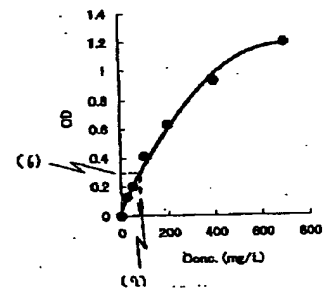
【符号の説明】

- (1) 支持体
- (2) 枠
- (3) 点着した検体を染色したドット
- (4) 検量線の範囲
- (5) 患者検体を染色したドット
- (6) 濃度未知検体の吸光度
- (7) 濃度未知検体の測定値

【図1】



【図2】



フロントページの続き

Fターム(参考) 2G045 AA16 BB14 BB21 BB22 BB24
BB51 CB03 DA36 DA38 FB15
GC10 JA01
4H045 AA30 CA44 EA50 FA80